

17.12.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

JP03/16188

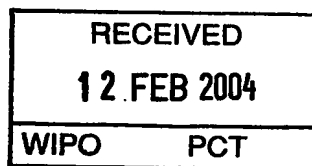
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 2 年 1 2 月 1 8 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 2 - 3 6 7 2 7 2  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [J P 2 0 0 2 - 3 6 7 2 7 2]

出 願 人      玉 巻 伸 章  
Applicant(s):



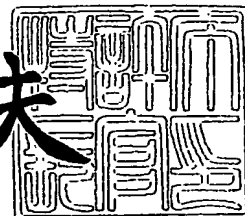
Best Available Copy

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 月 2 9 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02520-YS

【提出日】 平成14年12月18日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 5/06  
A61K 35/30

【発明の名称】 G A B A 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の  
分離方法

【請求項の数】 12

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府堺市南野田 3 5 2 - 3

【氏名】 玉巻 伸章

【特許出願人】

【識別番号】 392033783

【氏名又は名称】 玉巻 伸章

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 GABA作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 GABA作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

- (a) ドナーの組織からGABA作動性神経細胞前駆細胞を含む組織を切り出して分散する工程；
- (b) 抑制性神経伝達物質GABAの合成酵素GAD67のプロモーター下流に、生体でも検出できる蛍光を発するレポーター遺伝子をつないだDNAを分散した細胞に導入する工程；
- (c) レポーター蛋白の蛍光の有無によりGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；
- (d) 増殖能を持つことによりGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】 GABA作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

- (a) ドナーの組織からGABA作動性神経細胞前駆細胞を含む組織を切り出して分散する工程；
- (b) 抑制性神経伝達物質GABAの合成酵素GAD67のプロモーター下流に、薬剤耐性遺伝子をつないだDNAを分散した細胞に導入する工程；
- (c) 薬剤耐性の有無によりGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；
- (d) 増殖能を持つことによりGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 3】 GABA作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

- (a) ドナーの組織からGABA作動性神経細胞前駆細胞を含む組織を切り出して分散する工程；
- (b) 抑制性神経伝達物質GABAの合成酵素GAD67のプロモーター下流に、遺伝子組み

換え酵素のDNAを結合したDNAと、遺伝子組み換え後に生体細胞で可視化できるレポーターが発現するカセットDNAを分散した細胞に導入する工程；

(c) レポーター蛋白の蛍光の有無によりGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；

(d) 増殖能を持つことによりGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、を含むことを特徴とする方法。

【請求項4】 GABA作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

(a) ドナーの組織からGABA作動性神経細胞前駆細胞を含む組織を切り出して分散する工程；

(b) 抑制性神経伝達物質GABAの合成酵素GAD67のプロモーター下流に、遺伝子組み換え酵素のDNAを結合したDNAと、遺伝子組み換え後に薬剤耐性の性質を付与する蛋白を発現するカセットDNAを分散した細胞に導入する工程；

(c) 薬剤耐性の有無によりGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；

(d) 増殖能を持つことによりGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、を含むことを特徴とする方法。

【請求項5】 DNA導入法が、ウイルスを介した形質転換を含む、請求項1から4のいずれかの方法。

【請求項6】 DNA導入法が、電気穿孔を含む、請求項1から4のいずれかの方法。

【請求項7】 DNA導入法が、リポソームを介した形質転換を含む、請求項1から4のいずれかの方法。

【請求項8】 ドナーが哺乳動物である、請求項1から4のいずれかの方法。

【請求項9】 哺乳動物がヒトである、請求項8の方法。

【請求項10】 さらに、ステップ(d)で分離した細胞をレシピエントに移植することを含む、請求項1から4のいずれかの方法。

【請求項11】 請求項1から9のいずれかの方法により得られた、GABA作

動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞。

【請求項12】 請求項1から9のいずれかの方法において、GABA作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞を得るために試用する試薬および細胞のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、抑制性神経細胞を欠落した乃至は減少した領域の抑制性神経細胞の数を正常値に戻すことに用いる、GABA作動性神経細胞のみを生み出すGABA作動性神経細胞前駆細胞を分離する方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、GABA作動性神経細胞前駆細胞の分離を可能にすることにより、GABA作動性神経細胞を欠落した乃至は減少した領域を正常に戻すことにより、癲癇症や分裂病の治療を行う治療行為を可能にする医療用材料等としての前駆細胞分離方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

中枢神経系の神経細胞には興奮性の神経細胞と抑制性の神経細胞がある。両者の神経細胞が中枢神経の領域により異なる様々な比率で含まれていて、情報処理が行われている。大脳皮質では抑制性神経細胞は神経伝達物質として-aminobutyric acid (GABA)を使い、興奮性神経細胞はGlutamateを使う。大脳皮質の抑制性神経細胞は神経細胞の20%程度の比率で存在することにより、神経回路全体としては適度な活動度を維持することができ、スムーズな情報処理を営むことができる。しかしながら時として、全ての神経細胞が興奮し始め、結果として意識を失う癲癇発作が起きる。このような発作が起きる原因には、子供の間は脳の神経回路発達が未熟なために、発熱により神経細胞が興奮しやすくなって生じる熱性痙攣もあるが、多くは遺伝的背景があり、癲癇症患者の多くは、神経細胞の興奮に関わるチャンネル分子にポイント変異があり、興奮しやすくなっていると考えられている。また細胞移動の分子メカニズムに異常がある場合には大脳皮質の灰白質部が二分してしまい、入出力関係がアンバランスになり、癲癇様発作を繰り返す場合もある。いずれの場合も、神経回路に生じたショート様の異常状態であり

、過発火により多量のカルシウムが細胞体に流入することにより細胞死に至ることが考えられる。しかし全ての神経細胞に起こるわけではなく、このようなショートの状態が起こるのを止める役目にある抑制性神経細胞が特に過大な入力を受け、他の興奮性神経細胞よりも先に死滅して行く。このような状態になると難治性の癲癇発作のフォーカスと呼ばれ、フォーカスにある抑制性神経細胞は激滅していて、繰り返し癲癇発作の発祥元となる。このような状態にある難治性の癲癇症では治療薬では追いつかず、フォーカス領域を切除して癲癇発作の発生を抑える根治療法が行われる。しかし脳の一部を切除するため切除される脳が持っていた機能は失われる。このような癲癇発作フォーカスにGABA作動性神経細胞前駆細胞を移植により供給して生着させることができたならば癲癇発作を抑えることが期待できる。この目的のために必要となるGABA作動性神経細胞はどのようなものであってもいいのではなく、百を超えるGABA作動性神経細胞のサブタイプの内の、大脳皮質の興奮性の神経細胞の活動を抑えることのできるGABA神経細胞でなければならない。例えば癲癇症の患者のフォーカスにはどのようなサブタイプのGABA作動性神経細胞を移植すれば良いかと言えば、興奮性神経細胞が興奮するつどに、周りの興奮性神経細胞からの戻されてくる興奮性入力に対抗し抑制できる、細胞体部分に抑制を加えるバスケット細胞や軸索起始部に抑制を加えるシャンデリア細胞が必要となる。

### 【0003】

現在までのところ人間の大脳新皮質GABA作動性神経細胞の起源は十分に理解されていなかった。この出願の発明者はこれまでに、げっ歯類の大脳皮質GABA作動性神経細胞の起源は大脳基底核原基に起源を持つことを発見し、1997年に11月1日に報告している(Tamamaki et al., J. Neurosci 17: 8313-8323 1997)。またこれとは別に、米国のAnderson S.も、1997年に10月27日に同様の報告している(Anderson et al., Science 278: 474-476 1997)。さらにその起源は、大脳基底核原基の中でも内側基底核原基に限られることが報告されており(Lavdas et al. J. Neurosci 19:7881-7888 1999)、大脳基底核原基の中でも内側に限られることは、胎児組織の移植によっても確認されている(Wichterle et al., Development 128:3759-3771 2001)。しかし大脳基底核原基以外に起源が無いのかの点は確

認められていなかった。そのような中、人間ではGABA作動性神経細胞の起源が脳皮質にもあり、65%は脳皮質で、35%は脳基底核原基で作られるとする報告がある (Letinic et al., Nature 417: 645-649 2002)。この報告にある65%の脳皮質由来のGABA作動性神経細胞前駆細胞は、脳室帯ないし脳室下帯にある神経幹細胞の分裂により供給され、Mash1陽性で特徴付けられると考えた。しかし、このような観察結果は、この出願の発明者のげっ歯類でのGABA作動性神経細胞の起源を調べた最新の研究での個々の観察結果と一部一致するものであるが、起源に関する解釈は発明者の解釈と大きく異なるものである。この出願の発明者のげっ歯類での研究によれば、GABA作動性神経細胞の起源は脳基底核原基にあり、脳皮質に移動したGABA作動性神経細胞の一部は前駆細胞に脱分化するか、脳皮質に移動したGABA含有細胞の一部は前駆細胞であり、脳皮質で新たにGABA作動性神経細胞を供給していると考えられる。人間の場合も、観察結果の同一性から考えて、脳皮質のGABA作動性神経細胞は、脳基底核原基の細胞に由来すると考えられる。

#### 【0004】

しかしGABA作動性神経細胞前駆細胞は脳新皮質内のみで見られるものではない。ES細胞や神経幹細胞を培養する際に適当な培養条件を設けると、同細胞は神経前駆細胞に分化を始め、分化した神経前駆細胞の多くのものがGABA作動性神経細胞も産生するようになる。これらのGABA作動性神経細胞前駆細胞を、癲癇症患者の発作フォーカスに移植により供給して生着させることができたならば癲癇発作を抑えることも期待できるが、これまでのところ培養条件下で得られたGABA作動性神経細胞はGABAを含まない神経細胞、グリア細胞との混合物としてしか得ることができていない。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

この出願の発明は、癲癇症、分裂病など脳のGABA作動性神経細胞の異常に起因する病気を治療するのに用いる移植用GABA作動性神経細胞前駆細胞を組織や胚性幹細胞や神経幹細胞より誘導した細胞塊より分離する方法を提供することを課題としている。またこの出願の発明は、分離されたGABA作動性神経細胞前駆細胞

それ自身を提供することを課題としている。この発明によって得られたGABA作動性神経細胞前駆細胞前駆細胞は、適切な条件下で培養するとは増殖し、人大脳新皮質に移植すればGABA作動性神経細胞に分化し、大脳皮質の神経回路に組み込まれる。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決する発明として、GABA作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

- (a) ドナーの組織からGABA作動性神経細胞前駆細胞を含む組織を切り出して分散する工程；
- (b) 抑制性神経伝達物質GABAの合成酵素GAD67のプロモーター下流に、生体でも検出できる蛍光を発するレポーター遺伝子をつないだDNAを分散した細胞に導入する工程；
- (c) レポーター蛋白の蛍光の有無によりGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；
- (d) 増殖能を持つことによりGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、を含むことを特徴とする方法を提供する。

#### 【0007】

またこの出願の発明は、GABA作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

- (a) ドナーの組織からGABA作動性神経細胞前駆細胞を含む組織を切り出して分散する工程；
- (b) 抑制性神経伝達物質GABAの合成酵素GAD67のプロモーター下流に、薬剤耐性遺伝子をつないだDNAを分散した細胞に導入する工程；
- (c) 薬剤耐性の有無によりGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；
- (d) 増殖能を持つことによりGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、を含むことを特徴とする方法を提供する。

#### 【0008】



さらにこの出願の発明は、GABA作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

- (a) ドナーの組織からGABA作動性神経細胞前駆細胞を含む組織を切り出して分散する工程；
- (b) 抑制性神経伝達物質GABAの合成酵素GAD67のプロモーター下流に、遺伝子組み換え酵素のDNAを結合したDNAと、遺伝子組み換え後に生体細胞で可視化できるレポーターが発現するカセットDNAを分散した細胞に導入する工程；
- (c) レポーター蛋白の蛍光の有無によりGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；
- (d) 増殖能を持つことによりGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、を含むことを特徴とする方法を提供する。

#### 【0009】

さらにまた、この出願の発明は、GABA作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

- (a) ドナーの組織からGABA作動性神経細胞前駆細胞を含む組織を切り出して分散する工程；
- (b) 抑制性神経伝達物質GABAの合成酵素GAD67のプロモーター下流に、遺伝子組み換え酵素のDNAを結合したDNAと、遺伝子組み換え後に薬剤耐性の性質を付与する蛋白を発現するカセットDNAを分散した細胞に導入する工程；
- (c) 薬剤耐性の有無によりGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；
- (d) 増殖能を持つことによりGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、を含むことを特徴とする方法を提供する。

#### 【0010】

前記の各発明においては、DNA導入法が、ウイルスを介した形質転換、電気穿孔、リボソームを介した形質転換のいずれかを含むことを好ましい態様としている。

#### 【0011】

また前記の各発明においては、ドナーが哺乳動物であること、そして哺乳動物

がヒトであることを別の好ましい態様としている。

#### 【0012】

またさらに、前記の各発明においては、さらに、ステップ(d)で分離した細胞をレシピエントに移植することを含むことを好ましい態様としてもいる。

#### 【0013】

この出願の発明はさらに、前記発明のいずれかの方法により得られた、GABA作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞を提供する。

#### 【0014】

さらにまた、前記発明のいずれかの方法において、GABA作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞を得るために試用する試薬および細胞のキットを提供する。

#### 【0015】

この出願の前記発明において、神経幹細胞は、中枢神経系を構成する全ての種の細胞を供給することのできる細胞であるのに対し、「前駆細胞」とは、神経幹細胞から生み出され、増殖することができるが、限られた細胞種に分化しうる細胞のことをいう。例えば、希突起膠細胞の前駆細胞として、O-2A progenitor cellが知られているし、GABA作動性神経細胞の前駆細胞としては、嗅球顆粒細胞を供給する前脳胞脳室下帯の前駆細胞が知られている。しかしこれまでに、大脳新皮質の実質内に大脳新皮質のGABA作動性神経細胞を生み出す前駆細胞が存在することは知られていなかった。この出願の発明者による以下の観察結果は、GABA作動性神経細胞の前駆細胞が脳実質内に存在する直接および間接証拠である。

1. 胎児期E16のマウスにBrdUを取り込ませ、直ちに還流固定してBrdU、MAP2の二重標識をすると、中間帯のMAP2陽性移動細胞がBrdU免疫活性と重なるものが見つかる。これは、中間帯のMAP2陽性移動神経細胞（GABA含有神経細胞）が、細胞分裂に備えてDNAを複製していたことを意味する。

2. 誕生直ぐのGAD67-GFP knock-in マウスに同様のBrdUパルスラベルを行っても、GFP陽性GABA作動性神経細胞の中にもBrdU免疫活性を持つものがあり、二重標識されて確認される。二重標識されたGFP陽性神経細胞は、細胞分裂に備えてDNAを複製していたことを意味する。

3. 発明者が行った実験によると、胎児大脳側脳室にGAP43-EGFPを発現させるア

デノウイルスを注入し、脳室帯に感染させ、生後20日目にGFP陽性神経細胞を見ると、E17以前にウイルスを注入したときにはGABA作動性神経細胞と思われる非錐体細胞が多く観察されるが、E17以降にウイルスを注入しても非錐体細胞は観察されなくなる。それに対し、幾つかの他の研究室からの報告によると、BrdU注入による実験では、GABA作動性神経細胞はE14以降、出産後まで続けて分裂増殖しているとされている。この二つの実験の意味するところは、E17以降大脳皮質にGABA神経細胞を供給する前駆細胞は、アデノウイルスが側脳室から感染できる脳室帯には存在しなくなるが、脳実質内の何処かで分裂し続けていることを意味する。

4. マウスE15胎児の大脳側脳室にアデノウイルスを胎児大脳側脳室に注入したときに見られるGABA作動性神経細胞と思われる非錐体細胞は、様々な形態を持つサブタイプに分かれる。それぞれのタイプは、異なる幹細胞から生み出されたと考えられている。SV40 originを持たず、細胞増殖の際に増えることの無いアデノウイルスを感染させたときには、ほとんど同一のサブタイプの非錐体細胞を同一サンプルで観察することは少なく、近傍に同一のサブタイプの非錐体細胞を観察することは無い。それに対し、SV40 originを入れた、細胞増殖の際に細胞とともに増えるアデノウイルスを感染させたときには、頻繁に複数の同一サブタイプの非錐体細胞が近接して分布するのを観察した。この観察結果の意味するところは、ひとつのGABA作動性神経細胞の前駆細胞は、同一サブタイプの非錐体細胞を大脳実質内で生み出していることを示唆している。

#### 【0016】

この出願の発明者は、大脳基底核原基の脳室帯にある神経幹細胞はGAD67陰性であるのに対し、GABA作動性神経細胞前駆細胞は、GABA作動性神経細胞のように神経回路を形成してGABAを分泌しているわけでもないにも拘らず、GABA合成酵素GAD67陽性であることを発見した。この発見は、GABA作動性神経細胞の分化の細胞系譜において、多種類の細胞を生み出す神経幹細胞とGABA作動性神経細胞のみを生み出すGABA作動性神経細胞前駆細胞を区別する明らかな形質の違いであった。

#### 【0017】

この様なGAD67 promoter活性を使ってGFPを発現させる試みは、GABA作動性神経細胞にGAD67 promoterにGFP cDNAをつないだDNAをジーンガンで導入した例が報告されている(Jin et al., Cereb Cortex 2001 11: 666-678)。また、GAD67 promoterの下流にGFP cDNAをつないで染色体上に組み込んだGAD67-GFP knock-in mouseでは、GFPがほぼ100%の精度でGAD67陽性細胞に発現していた(Tamamaki et al., submitted)。このマウスを使ってGABA作動性神経細胞前駆細胞を観察したところ、緑色蛍光を発しているところが観察された(Nakamura et al., in preparation)。この違いを利用して、神経幹細胞や他の種の細胞から、GABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞を分離し、さらにGABA作動性神経細胞前駆細胞のみを分離する。

#### 【0018】

##### 【課題を解決する手段】

##### 大脳新皮質内のGABA作動性神経細胞前駆細胞の分離

胚性幹細胞や神経幹細胞から誘導された場合においても(Westmoreland et al., 2001)、生体内でも(Nakamura et al., in preparation)、GABA作動性神経細胞前駆細胞はGAD67 promoterが活性を持つ。GAD67のプロモーター下流に生体でも検出できる蛍光を発するレポーター遺伝子や薬剤耐性遺伝子を繋ぎ、GABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞を含む細胞集団に導入することで、レポーター蛋白の蛍光や薬剤耐性でGABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞を確認することができる。蛍光を放つGABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞はセルソーターで分離ができるし、薬剤耐性のGABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞は薬剤を培養液に加えることにより分離できる。このとき培養液中で永く培養増殖させれば、分裂能のGABA作動性神経細胞前駆細胞のみを得ることができる。

#### 【0019】

例えば緑色の蛍光を発するくらげ蛋白、Green Fluorescent Protein (GFP) cDNAをGAD67 promoterにつないだDNA(図1の1)を、DNA細胞内導入試薬やウイルス、電気穿孔法などで導入するとGABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞が緑色蛍光を発する。このGABA作動性神経細胞前駆細胞を含む組織を切り出

し、0.05% Trypsine-EDTAで処理することで個々の細胞を分散させ、細胞撚濁液をセルソーターにかけることでGABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞を分離することができる。分離した細胞を、大脳皮質と大脳基底核原基を含む脳のスライスを培養したconditioned mediumを用いて分離したGABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞を培養増殖させると、GABA作動性神経細胞前駆細胞は増殖し、GABA作動性神経細胞は暫時その数を減らしていく。

#### 【0020】

GFPの代わりに、neo mycine耐性遺伝子をGAD67 promoterにつなぎ(図1の2)、GABA作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞群に導入する。同細胞群を分散培養する際の培養液にGeneticin (G418)を入れて培養をすることで、GAD67 promoter活性を持つGABA作動性神経細胞前駆細胞以外は死滅するので、GABA作動性神経細胞前駆細胞のみを選び出すことができる。

#### 【0021】

しかし、GAD67プロモーター活性はGABA作動性神経細胞前駆細胞の細胞周期に伴い変化するのに加え、概してとGABA作動性神経細胞のそれより常に低い。そのままGAD67 promoterをGFPやneoのDNAにつないでも、現在我々が細胞系譜に従って分類しているprimary GABAergic neuron progenitor, secondary GABAergic neuron progenitorによってGAD67 promoter活性の強さが異なることがあり、GABA神経細胞前駆細胞の種類によって採取効率に影響が出ることが考えられる。この影響を除くため、図1の3-5にあるようなDNAコンストラクトを準備する。図1の3では、DNA組み換え蛋白としてcre recombinaseを用いているが、これは使用できるDNA組み換え蛋白をcre recombinaseに限ることを意味しているのではない。図1の4-5に、DNA組み換え酵素が認識するDNA配列(例えばloxP)が順方向に二つ並ぶ間に、生体細胞を可視化できるレポーターDNA(例えばGFP)や、薬剤耐性遺伝子DNA(例えばneo mycin耐性遺伝子)を配置し、強制発現プロモーター(例えばCA promoter、日本特許番号2824433、2824434)を含むDNAに結合させておく。この二つのDNAコンストラクト(3と4、乃至は3と5)を、GABA作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞群に導入する。GABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞ではGAD67 promoter活性があるので、DNA組み換え酵素が発

現し、二つのDNA組み換え酵素が認識するDNA配列の間で組み換えが起こり、その間にあったstop codonは除去される。その結果、生体細胞を可視化できるレポーター（例えばGFP）を発現させた場合は、セルソーターを用いてGABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞を分離することができ、薬剤耐性蛋白を発現させた場合は、培養液中に薬剤（例えばGenetisin）を入れることでGABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞だけが選別される（図2）。さらに大脳皮質と大脳基底核原基を含む脳のスライスを培養したconditioned mediumを用いて培養を続けると、GABA作動性神経細胞前駆細胞は増殖し、GABA作動性神経細胞は暫時その数を減らしていく。

#### 【0022】

##### 【発明の効果】

これまで、胚性幹細胞や神経幹細胞の培養条件を調節することで、GABA作動性神経細胞を始め様々な細胞が誘導されてきた。しかし何れの条件でも、単一種の細胞のみを産生する系はなく、治療に用いる前に再度の分離が必要となり、細胞活性を損なうこととなっていた。この出願の発明によって、GABA作動性神経細胞前駆細胞が純度高く得られる。GABA作動性神経細胞前駆細胞はGAD67陽性であり、GAD67陽性の細胞を産生するので、脳内ではGAD67陽性細胞はGABA作動性神経細胞だけであることを考えると、GABA作動性神経細胞前駆細胞を培養することにより、GABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞のみを生み出す系が提供される。

#### 【0023】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

#### 【0024】

##### 【実施例】

##### 実施例 1

GAD67 promoterの直ぐ下流にGFP cDNAをつないだコンストラクトをgene targeting方を用いてゲノムDNA中に相同組み換えを利用して挿入したマウス、GAD67-GFP knock-in mouseを用いて、その大脳皮質内のGABA作動性神経細胞前駆細胞を

分離した。このマウスのゲノム上には図1の1にあるDNAを導入したのと同じ状態が全ての細胞に形成されている。それ故、GAD67 promoter活性のある細胞は全てGFPを発現しており、また逆に、GFPを発現している細胞は全てGAD67陽性であり、脳内ではGABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞と見なしうことは、先に調べて報告済みである (Tamamaki et al., submitted)。

#### 【0025】

大脳皮質ではGABA作動性神経細胞前駆細胞がGABA作動性神経細胞を産生し続けている出産直後ないしは、胎生18日目のGAD67-GFP knock-in mouseの大脳皮質を取り出し、0.5%トリプシン蛋白分解酵素で処理をすることで細胞外基質と細胞接着分子を部分分解することにより、細胞を分散させた。分散させた細胞をPBSで浸し、FACS (fluorescence activated cell sorter)に通し、GFP陽性細胞を培養液に受け取った (図2-2)。この際、採取された細胞のGFP蛍光強度は図3の左上に示されている。培養液の組成は、ニューロスフェア法 (Reynolds and Weiss, 1992; Vescovi et al., 1993; Gritti et al., 1996) にある、神経幹細胞をneurosphere法で用いられた細胞増殖因子を加えただけの基本培養液を、予め大脳皮質と大脳基底核原基を一日培養して調整し、GABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞を培養した。

#### 【0026】

細胞採取後、培養液中でGABA作動性神経細胞前駆細胞の一部は、細胞分裂をはじめた。図3の下図は、分裂した細胞であるが、細胞分裂した細胞を確認するために培養液中に混ぜておいたBrdUを核内DNAに取り込んでいた。この時DNA合成阻害剤を培養液に加えておくと、図3の右上図にあるようにBrdUはDNAに取り込まれなかったことから、細胞増殖によるBrdUの取り込みであったことが確かめられた。また分裂した後の二つの娘細胞は、両方ともGFP陽性であり、二つの一次GABA作動性神経細胞前駆細胞、ないしは一つの一次GABA作動性神経細胞前駆細胞と一つの二次GABA作動性神経細胞前駆細胞、ないしは二つの二次GABA作動性神経細胞前駆細胞、ないしは二つのGABA作動性神経細胞を生み出したと考えられる。何れの場合であっても、それ以降培養条件が整えられていれば、GABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞関連細胞のみが生み出し続けられることが期

待された。

### 【0027】

#### 【発明の効果】

これまで、胚性幹細胞や神経幹細胞の培養条件を調節することで、GABA作動性神経細胞を始め様々な細胞が誘導されてきた。しかし何れの条件でも、単一種の細胞のみを産生する系はなく、治療に用いる前に再度の分離が必要となり、細胞活性を損なうこととなっていた。この出願の発明によって、GABA作動性神経細胞前駆細胞が純度高く得られる。GABA作動性神経細胞前駆細胞はGAD67陽性であり、GAD67陽性の細胞を産生するので、脳内ではGAD67陽性細胞はGABA作動性神経細胞だけであることを考えると、GABA作動性神経細胞前駆細胞を培養することにより、GABA作動性神経細胞前駆細胞とGABA作動性神経細胞のみを生み出す系が提供される。

### 【0028】

#### 【参考文献】

Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JLR. (1997) Interneuron migration from the basal forebrain to the neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278: 474-476.

Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL. (1996) Multipotentia l stem cells from the adult

mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 16: 1091-1100.

Jin X, Mathers PH, Szabo G, Katarova Z, Agmon A. (2001) Vertical bias in dendritic trees of non-pyramidal neocortical neurons expressing GAD67-GFP in vitro. *Cereb Cortex*. 11: 666-678.

Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG. (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19: 7881-7888.



Letinic K, Zoncu R, Rakic P. (2002) Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 417: 645-649.

Nakamura K, Nakamura K, Kometani K, Yanagawa Y, Iwasato T, Obata K, Minato K, Kaneko T, Tamamaki N. (2003) Evidence that GABAergic-neuron-progenitors originating in the ventral telencephalon proliferate in the parenchyma of the developing mouse neocortex. (in preparation).

Porteus MH, Bulfone A, Liu JK, Puellas L, Lo LC, Rubenstein JL. (1994) Dlx-2, Mash-1, and MAP-2 expression and bromodeoxyuridine incorporation define molecularly distinct cell populations in the embryonic mouse forebrain. *J Neurosci* 14: 6370-6383.

Reynolds BA, Weiss S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-10.

Tamamaki N, Fujimori K, Takauji R. (1997) Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* 17:8313-8323.

Tamamaki N, Sugimoto Y, Tanaka K, Takauji R. (1999) Cell migration from the ganglionic eminence to the neocortex investigated by labeling nuclei with UV irradiation via a fiber optic cable. *Neurosci Res.* 35: 241-251.

Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T. (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the gad67-gfp knock-in mouse. *J Comp Neurol* (submitted).

Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S. (1993) bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11: 951-966.

Westmoreland JJ, Hancock CR, Condie BG (2001) Neuronal development of embryonic stem cells: a model of GABAergic neuron differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 674-680.

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

この発明の方法を実施するのに必要となるDNAコンストラクトを1から5に示す。1-2は、直接GAD67 promoterにGFP遺伝子や neo mycin耐性遺伝子をつないだもので、GABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞でGFPやneo mycinが発現し、GABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を分離するために利用する。3-7はGAD67 promoter活性によって発現するcre recombinaseを利用して、GFPやneo mycinをGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞に発現させて、GABA作動性神経細胞前駆細胞を分離するために利用する。詳しくは、3は、GAD67 promoterにcre recombinase DNAをつないだコンストラクトであり、4はGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を、GFPの発現を利用して分離する方法に使うDNAコンストラクトである。5はGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を、neo mycin感受性を使って分離する方法に使うDNAコンストラクトである。

## 【図 2】

実施例1の説明図である。(2-1)は、薬剤耐性遺伝子(neo mycin耐性遺伝子)を利用したGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞の分離法を示す。図にある二種類のDNAコンストラクト(図1の3番と5番)を細胞に導入した場合、GABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞ではGAD67 promoter活性のためcre recombinaseが発現し、stop signal DNAは切り取られ、neo mycin耐性を獲得するので、neo mycin分解酵素の発現によりGeneticinなどで選別することができる。遺伝子の導入には、レトロウイルスや一時的な発現せる真核細胞での複製オリジンを持つアデノウイルスなどによって導入が可能である。(2-2)は、生体細胞を可視化できるレポーターDNA(GFP)を利用したGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞の分離法を示す。図にある二種類のDNAコンストラクト(図1の3番と4番)を細胞に導入した場合、GABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞ではGAD67 promoter活性のためcre recombinaseが発現し、stop codon配列は切り取られ、CAプロモーターによりGFPの発現が始まる。結果GFP蛍光の有無によりセルソーターを使ってGABA作動性神経細胞

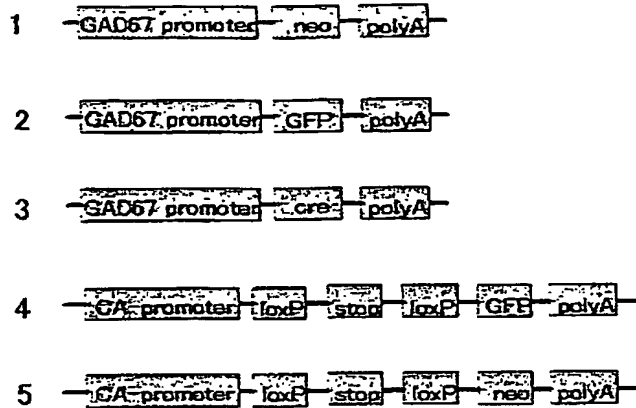
胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を選別することができる。上記遺伝子の導入には、レトロウイルスや一時的な発現をさせる真核細胞での複製オリジンを持つアデノウイルスなどによって導入が可能である。

【図3】

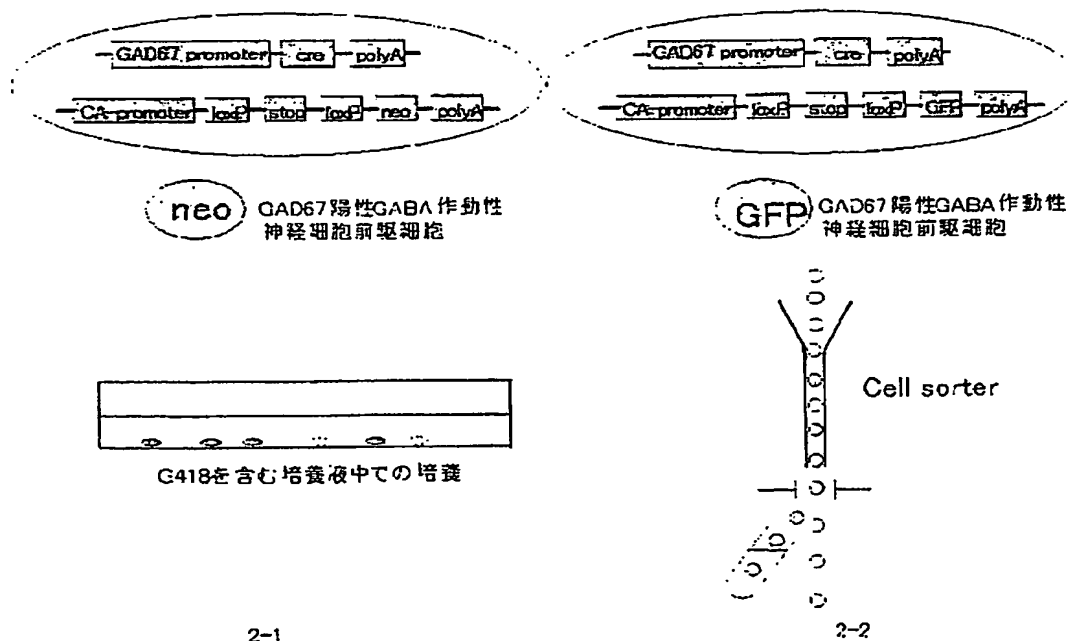
GAD67 promoterの下流にGFP cDNAを結合してGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞をセルソーターを使って分離した際のデーターを示す。左上は、細胞数とGFP蛍光強度の関係をグラフにしたもので、コントロールに比べて蛍光を有意に発している範囲の細胞を採集した。採集した細胞は、細胞増殖因子を加えただけの基本培養液を予め大脳皮質と大脳基底核原基を一日培養して調整した培養液中で培養した。さらにBrdUを添加して細胞増殖の際のDNA合成を検出した。右上の図にあるようにGABA作動性神経細胞前駆細胞はBrdUを取り込んだが、DNA合成阻害剤を加えるとDNAへの取り込みは見られなかった。下の図はGFP陽性のGABA作動性神経細胞前駆細胞がBrdUを二つの核中のDNAに取り込んで、分裂しているところの像である。

【書類名】 図面

【図 1】

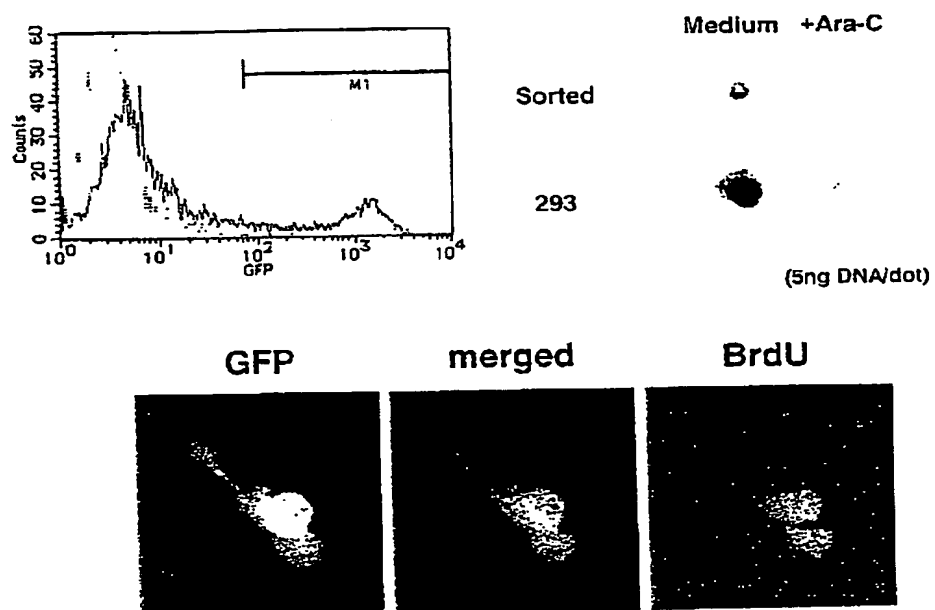


【図 2】



【図 3】

# Dotblotting and immunocytochemistry for BrdU in sorted cells



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 癲癇症患者や分裂病患者の脳内でGABA作動性神経細胞が欠如ないしは減少した領域にGABA作動性神経細胞前駆細胞を移植することにより、同疾患の治療を行うことを目的として、成体又は胎児神経組織中のGABA作動性神経細胞前駆細胞、ないしは胚性幹細胞から誘導したGABA作動性神経細胞前駆細胞を、GAD67 promoter活性を利用して分離する方法を提示する。

【解決手段】 ドナーの組織からGABA作動性神経細胞前駆細胞を含む組織を切り出して分散する工程、抑制性神経伝達物質GABAの合成酵素GAD67のプロモーター下流に、生体でも検出できる蛍光を発するレポーター遺伝子をつないだDNAを分散した細胞に導入する工程、レポーター蛋白の蛍光の有無によりGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、および増殖能を持つことによりGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程を含む。

【選択図】 図2

特願 2002-367272

出願人履歴情報

識別番号 [392033783]

1. 変更年月日	2000年 2月16日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府堺市南野田352-3
氏 名	玉巻 伸章

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKewed/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**